

527664

Rec'd PCT/PTO 11 MAR 2005

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international

PCT

10/527664

(10) Numéro de publication internationale  
WO 2004/029092 A2(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
C07K 16/00, A61K 39/395, A61P 35/00, 31/00ROMEUF, Christophe [FR/FR]; 116, rue de la Bassée,  
F-59000 Lille (FR). GLACET, Arnaud [FR/FR]; 46,  
rue Ringot, F-59147 Gondrecourt (FR). LIROCHON,  
Jacky [FR/FR]; 7, rue des Vignes, F-91650 Breuillet (FR).  
BOUREL, Dominique [FR/FR]; 35, avenue Germaine,  
F-59110 La Madeleine (FR).(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2003/002713(22) Date de dépôt international :  
15 septembre 2003 (15.09.2003)(74) Mandataires : MARTIN, Jean-Jacques, etc.; Cabinet  
Regimbeau, 20, rue de chazelles, F-75847 Paris Cedex 17  
(FR).

(25) Langue de dépôt : français

(81) États désignés (national) : AU, CA, IL, JP, US.

(26) Langue de publication : français

(84) États désignés (régional) : brevet européen (AT, BE, BG,  
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,  
IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).(30) Données relatives à la priorité :  
02/11415 13 septembre 2002 (13.09.2002) FR  
02/11416 13 septembre 2002 (13.09.2002) FR  
03/07067 12 juin 2003 (12.06.2003) FRPubliée :  
— sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapport(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : LABO-  
RATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT ET  
DES BIOTECHNOLOGIES [FR/FR]; Zone d'Activité  
de Courtabœuf, 3, avenue des Tropiques, F-91940 Les Ulis  
(FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(72) Inventeurs; et  
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : de

WO 2004/029092 A2

(54) Title: ANTIBODY FOR ADCC AND INDUCING CYTOKINE PRODUCTION

(54) Titre : ANTICORPS POUR ADCC ET INDUISANT LA PRODUCTION DE CYTOKINES.

(57) Abstract: The invention concerns chimeric monoclonal antibodies, humanized or human produced in selected cell lines, said antibodies exhibiting high affinity for the CD16 receptor of effector cells of the immune system and hence capable of inducing high ADCC, but also the property of inducing cytokine and interleukin secretion, in particular IFN $\gamma$ , which can enhance the ADCC activity of effector cells and hence be used for treating cancers and infections by pathogenic agents.(57) Abrégé : La présente invention concerne des anticorps monoclonaux chimériques, humanisés ou humains qui sont produits dans des lignées cellulaires sélectionnées, lesdits anticorps présentant une forte affinité pour le récepteur CD 16 des cellules effectrices du système immunitaire et ainsi capables d'induire une forte ADCC, mais également la propriété d'induire la sécrétion de cytokines et d'interleukines, en particulier l' IFN $\gamma$ , qui peut renforcer l'activité ADCC des cellules effectrices et ainsi s'appliquer au traitement des cancers et des infections par des agents pathogènes.

BEST AVAILABLE COPY

**Anticorps pour ADCC et induisant la production de cytokines**

5 La présente invention concerne des anticorps monoclonaux chimériques humanisés ou humains qui sont produits dans des lignées cellulaires sélectionnées, lesdits anticorps présentant une forte affinité pour le récepteur CD16 des cellules effectrices du système immunitaire mais également la propriété d'induire la sécrétion de cytokines et d'interleukines, qui peuvent moduler l'activité cytotoxique des cellules effectrices.

10

L'immunothérapie au moyen d'anticorps monoclonaux est en passe de devenir un des aspects les plus importants de la médecine. En revanche, les résultats obtenus lors d'essais cliniques apparaissent contrastés. En effet, il peut s'avérer que l'anticorps monoclonal ne soit pas suffisamment efficace. De nombreux essais cliniques sont 15 arrêtés pour diverses causes telles que le manque d'efficacité et des effets secondaires incompatibles avec une utilisation en thérapie clinique. Ces deux aspects sont étroitement liés sachant que des anticorps peu actifs sont administrés à fortes doses pour compenser et obtenir une réponse thérapeutique. L'administration de forte dose induit non seulement des effets secondaires mais est économiquement peu viable.

20

Ces problèmes sont majeurs dans le développement industriel des anticorps monoclonaux, chimériques humanisés ou humains. A titre d'exemple, la société Protein Design Labs a suspendu les essais cliniques en phase I/II du Remitogen®, qui est un anticorps anti-HLA-DR pouvant être utilisé pour traiter les cancers de cellules 25 MHC de classe II positives, notamment les leucémies des cellules B et T.

30 Aujourd'hui, la recherche est orientée sur le fragment Fcγ de l'immunoglobuline afin d'améliorer les propriétés fonctionnelles des anticorps. A terme, cela devrait permettre l'obtention d'anticorps qui interagissent et activent les récepteurs des cellules effectrices (monocytes macrophage, lymphocyte B, cellules NK et dendritiques).

La fixation d'un anticorps sur son ligand peut induire une activation de certaines cellules effectrices via leurs récepteurs Fc, ce qui est l'objectif de la présente invention. Nous avons montré que certains anticorps non seulement supportaient des propriétés fonctionnelles, comme l'ADCC ou l'activation du complément, mais aussi induisaient 5 la production de cytokines. Ces cytokines, produites au site d'activation des effecteurs, peuvent exercer différentes activités biologiques.

Ainsi, il apparaît nécessaire de tester les propriétés des anticorps candidats à induire la production de ces facteurs modulant la réponse immunitaire. En effet, on a trouvé que 10 l'activation des récepteurs des cellules effectrices produit des réponses très différentes conduisant à la libération d'une ou plusieurs cytokines. Ces cytokines sont responsables de l'activation ou de l'inhibition de certains composants du système immunitaire selon le cas. Il peut s'avérer par exemple qu'un même anticorps dirigé contre un antigène donné soit complètement inefficace lors qu'il est produit dans des 15 lignées de myélome de souris, alors qu'il se montre très efficace lors qu'il est produit dans d'autres lignées cellulaires.

Par exemple, nous démontrons ici que la fixation d'un anticorps sur son ligand peut induire une activation de la cellule Jurkat transfectée CD16 avec comme conséquence 20 la sécrétion d'IL2. Une forte corrélation est observée entre la sécrétion d'IL2 par Jurkat CD16 et l'activité ADCC médiée par le CD16 des cellules effectrices.

Nous avions montré dans notre demande WO 01/77181 (LFB) l'importance de sélectionner des lignées cellulaires permettant de produire des anticorps présentant une forte activité ADCC du type Fc $\gamma$ RIII (CD16). Nous avions trouvé que la modification de la glycosylation du fragment constant des anticorps conduisait à améliorer l'activité ADCC dans des lignées de myélomes de rat telle que YB2/0. Les structures glycanniques étant de type biantennées, avec des chaînes courtes, une faible sialylation, des mannoses et GlcNAc du point d'attache terminaux non intercalaires, et 25 30 une faible fucosylation.

Or, dans le cadre de la présente invention, nous avons découvert que l'avantage de présenter une forte affinité pour le CD16 peut encore être renforcé par des tests supplémentaires visant à choisir les anticorps qui induisent la production de cytokines.

5

Les deux caractéristiques précitées se complémentent. En effet, la production de cytokines induites par les anticorps sélectionnés par le procédé de l'invention pourrait renforcer activité cytotoxique des anticorps. Le mécanisme d'action d'une telle activation tient probablement à une régulation positive autocrine des cellules 10 effectrices. On peut postuler que les anticorps se lient au CD16 provoquant une activité cytotoxique mais également induisent la production d'IFN gamma qui au final peut conduire à augmenter encore davantage l'activité cytotoxique.

L'invention propose donc des anticorps qui présentent une activité jusqu'à 100 fois 15 supérieure aux anticorps disponibles en thérapie. En particulier, l'invention apporte un anti-HLD-DR et un anti-CD20 significativement plus efficaces que leur homologue respectif tel que le Remitogen® et le Rutixan®. La présente invention marque un tournant majeur dans le développement des anticorps à visée clinique en apportant une nouvelle génération dont les doses efficaces pour obtenir 50% d'activité sont bien 20 inférieures à celles des anticorps actuellement utilisés.

### Description

Ainsi, l'invention se rapporte à un anticorps monoclonal chimérique, humanisés ou 25 humain produit dans une lignée cellulaire sélectionnée pour ses propriétés de glycosylation du fragment Fc d'un anticorps, ou dont la structure glycannique a été modifiée ex vivo, ledit anticorps présentant un taux ADCC de type FcγRIII (CD16) supérieur à 60 %, 70%, 80 % ou de préférence supérieur à 90 % comparé au même anticorps produit dans une lignée CHO ou à un anticorps homologue disponible dans le 30 commerce, caractérisé en ce qu'il présente une capacité à induire un taux de production

d'au moins une cytokine par une cellule effectrice du système immunitaire exprimant le récepteur CD16 supérieur à 60 %, 100 % ou de préférence supérieur à 200 % comparé au même anticorps produit dans une lignée CHO ou à un anticorps homologue disponible dans le commerce.

5

De préférence, cet anticorps présente un taux ADCC supérieure à 100 % à une concentration de 10ng/ml comparé au même anticorps produit dans une lignée CHO ou à un anticorps homologue disponible dans le commerce et un taux de production d'au moins une cytokine par une cellule effectrice du système immunitaire, en particulier celles exprimant le récepteur CD16 supérieur à 1000 % à une concentration de 10ng/ml comparé au même anticorps produit dans une lignée CHO ou à un anticorps homologue disponible dans le commerce.

10 Lesdites cytokines libérées sont des interleukines, des interférons et des facteurs de nécrose tissulaire (TNF).

15 Ainsi, l'anticorps est sélectionné pour sa capacité d'induire la sécrétion d'au moins une cytokine choisie parmi IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, ... TNFa, TGF $\beta$ , IP10 et IFN $\gamma$  par les cellules effectrices du système immunitaire en particulier celles exprimant le récepteur CD16.

20 De préférence, l'anticorps sélectionné a la capacité d'induire la sécrétion d' IFN $\gamma$  par les cellules effectrices du système immunitaire exprimant le récepteur CD16. Le taux d' IFN $\gamma$  sécrété reflète la qualité de l'anticorps fixé par le récepteur CD16 quant à son intégrité (fonction Fc) et à sa capacité (site antigénique) de liaison à l'antigène. En outre, la sécrétion d' IFN $\gamma$  contribue à renforcer l'activité cytotoxique des cellules effectrices.

Les cellules effectrices peuvent exprimer un CD16 endogène ou être transformées. On entend par cellule transformée, une cellule modifiée génétiquement de sorte à exprimer des récepteur Fc, en particulier le récepteur CD16.

- 5 Dans un mode de réalisation particulier, l'anticorps de l'invention est capable d'induire la sécrétion d'au moins une cytokine par une cellule leucocytaire, en particulier de la famille des NK (natural killer) ou par des cellules du groupe monocytes-macrophages. De préférence, on utilise pour la sélection des anticorps une lignée Jurkat transfectée avec un vecteur d'expression codant pour le récepteur CD16 comme cellule effectrice.
- 10 Cette lignée est particulièrement avantageuse car elle est immortalisée c'est à dire qu'elle se développe indéfiniment dans des milieux de cultures et qu'elle permet d'obtenir des résultats reproductibles de par sa stabilité d'expression du CD16.

- 15 En outre, l'anticorps peut être sélectionné après avoir été purifié et/ou modifié ex vivo par modification de la structure glycannique du fragment Fc.

La sélection peut se faire sur des anticorps produits par des cellules couramment utilisées pour la production d'anticorps thérapeutiques, telles que les lignées de myélomes de rat, en particulier YB2/0 et ses dérivés, les cellules lymphoblastoïdes humaines, les cellules d'insectes et les cellules de myélomes murines. La sélection peut également être appliquée à l'évaluation d'anticorps produits par des plantes transgéniques ou de mammifères transgéniques. A cet effet, la production dans CHO sert de référence (CHO étant employée pour la production d'anticorps médicamenteux) pour comparer et sélectionner les systèmes de production conduisant aux anticorps selon l'invention. Une autre alternative consiste à effectuer la comparaison avec les anticorps disponibles dans le commerce, en particulier les anticorps en cours de développement, les anticorps ayant obtenus une AMM ou encore des anticorps dont les essais cliniques ont été arrêtés et qui se sont révélés peu efficaces et/ou produisant des effets secondaires indésirables aux doses administrées. En effet, comme indiqué précédemment, les anticorps modifiés de l'invention sont jusqu'à 100 fois plus

efficaces pour activer l'ADCC des cellules effectrices du système immunitaires, ce qui implique des doses d'administration inférieures à celles pratiquées par les anticorps mentionnés précédemment.

5 L'anticorps de l'invention peut être produit dans des lignées cellulaires du type myélome de rat, notamment YB 2/0. Il peut être dirigé contre un antigène normal non ubiquitaire (exemple, l'anticorps est de spécificité anti- Rhésus D du globule rouge humain), ou un antigène d'une cellule pathologique ou d'un organisme pathogène pour l'homme, en particulier contre un antigène d'une cellule cancéreuse. Par

10 Dans un aspect préféré, l'anticorps est un anti-HLA-DR. Cet anticorps présente un taux ADCC supérieure à 100 % à une concentration de 10 ng/ml ou moins et un taux de production d'IL-2 par une cellule effectrice du système immunitaire exprimant le récepteur CD16 supérieur jusqu'à 1000 % à une concentration de 10 ng/ml comparé au même anticorps exprimé dans la lignée CHO, lignée d'expression du Remitogen®.

15

L'anti-HLA-DR de l'invention peut être produit dans une lignée de myélome de rat, notamment YB2/0.

20 Dans un autre aspect préféré, l'anticorps de l'invention est un anti-CD20. Cet anticorps présente un taux ADCC supérieure à 100 % à une concentration de 10 ng/ml ou moins et un taux de production d'IL-2 par la cellule Jurkat CD16 supérieur jusqu'à 1000 % à une concentration de 10ng/ml comparé au Rituxan®.

25

L'anti-CD20 de l'invention peut être produit dans une lignée de myélome de rat, notamment YB2/0.

D'autres anticorps peuvent être sélectionnés parmi les anti Ep-CAM, anti-KIR3DL2, anti-VEGFR, anti HER1, anti HER2, anti GD, anti GD2, anti GD3, anti CD-23, anti-CD30, anti-CD33, anti-CD38, anti-CD44, anti CD52, anti CA125 et anti ProteinC; des

anti-idiotypes spécifiques d'inhibiteurs par exemple de facteurs de coagulation dont le FVIII et FIX, les anti-viraux : HBV, HIV, HCV et RSV.

5 Dans un autre aspect, l'invention concerne l'utilisation d'un anticorps décrit ci-dessus, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement des cancers, par exemple l'anti-VEGFR et des infections par des agents pathogènes, par exemple l'anti-HIV.

10 Plus particulièrement, l'invention vise l'utilisation d'un anticorps Anti-HLA-DR ou anti-CD20 décrit plus haut pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement des cancers des cellules MHC de classe II positives, notamment les lymphomes de cellules B, les leucémies aiguës de cellules B, le lymphome de Burkitt, le lymphome de Hodgkin, les leucémies myéloïdes, les lymphomes et leucémies de cellules T, les lymphomes non hodgkinien et les leucémies myéloïdes chroniques.

15 Dans un aspect préféré de l'invention, l'anticorps peut dans un premier temps être sélectionné pour son affinité au récepteur CD16 puis testé et sélectionné tel que décrit ci-dessus pour ses propriétés à induire la production d'une cytokine, notamment l'IL-2, par les cellules Jurkat CD16 ou l'IFNy par les cellules effectrices sanguines exprimant le CD16.

20

De tels anticorps possédant cette double propriété d'induire l'ADCC via le CD16 et d'induire la production de l'IL-2 conduisent à une stimulation très importante de l'activité cytotoxique des cellules effectrices. Par exemple, cet anticorps peut être un anticorps listé ci-dessous produit dans toute lignée cellulaire et sélectionné par les tests mentionnés ci-dessus. Il s'agit d'anticorps de seconde génération plus efficaces que leurs homologues disponibles actuellement (voir tableau 1 ci-après).

**Tableau 1**

5

Nom et marque commerciale de l'anticorps	Société	cible	indication
Edrecolomab PANOREX	Centocor	anti Ep-CAM	colorectal cancer
Rituximab RITUXAN	Idec Licensing à Genentech/ Hoffman la roche	anti CD20	B cell lymphoma thrombocytopenia purpura
Trastuzumab HERCEPTIN	Genentech Licensing à Hoffman la roche/Immunogen	anti HER2	ovarian cancer
Palivizumab SYNAGIS	Medimmune Licensing à Abbott		RSV
Alemtuzumab CAMPATH	BTG Licensing à Schering	anti CD52	leukemia
ibritumomab tiuxetan ZEVALIN Cetuximab IMC-C225	IDEC Licensing à Schering Merck /BMS / Imclone	anti CD20	NHL
Bevacizumab AVASTIN	Genentech/ Hoffman la roche	anti VEGFR	cancers
Epratuzumab	Immumedics/ Amgen	anti CD22	cancers: non hogkin lymphoma cancers
Hu M195Mab	Protein Design . Labs	ND	

MDX-210	Immuno-Designed Molécules	ND	cancers
BEC2 Mitumomab	Imclone	anti GD3	cancers
Oregovomab <i>OVAREX</i>	Altarex	anti CA125	Ovarian cancer
Ecromeximab KW-2971	Kyowa-Hakko	anti GD	malignant melanoma
ABX-EGF	Abgenix	EGF	cancers
MDX010	Medarex	ND	Cancers
XTL 002 H11 SCFV	XTL biopharmaceuticals viventia biotech	ND	anti-viral : HCV
4B5	viventia biotech	anti GD2	Cancers
XTL 001	XTL biopharmaceuticals	ND	anti-viral : HBV
MDX-070	MEDAREX	Anti-PSMA	Prostate cancer
TNX-901	TANOX	anti CD-23	
IDEC-114	IDEC	inhibition ProteinC	non-Hodgkin lymphoma

L'invention porte également sur l'utilisation d'un anticorps décrit ci-dessus pour la fabrication d'un médicament destiné à induire l'expression de TNF, IFN $\gamma$ , IP10, IL8 et 5 IL-6 par les cellules effectrices naturelles du système immunitaire, ledit médicament étant utile notamment pour le traitement du cancer et des infections.

**Légendes et titres des figures :**

Figure 1: Lyse ADCC des cellules Raji, induite par des anticorps anti-HLA-DR exprimés dans CHO (triangle) ou YB2/0 (carré).

5 Figure 2: Sécrétion d'IL2 par les cellules Jurkat CD16, induite par des anticorps anti-HLA-DR exprimés dans CHO (triangle) ou YB2/0 (carré).

Figure 3: Corrélation entre le pourcentage d'ADCC supportée par les cellules NK et la sécrétion d'IL2 par les cellules Jurkat CD16.

Figure 4: IL8 sécrétée par les CMN en présence ou absence de cible

10 Figure 5: Sécrétion de cytokines par les CMN induite par les anticorps anti-Rhésus (valeur sans cible déduite) Tox 324 03 062

Figure 6: Sécrétion de cytokines par les polynucléaires induite par les anticorps anti-Rhésus

Figure 7: Sécrétion de cytokines par les NK induite par les anticorps anti-Rhésus

15 Figure 8: Sécrétion de TNF alpha par les cellules NK, induite par les anticorps anti-CD20 et anti-HLA-DR exprimés dans CH et YB2/0 (324 03 082)

Figure 9: Sécrétion d'IFN gamma par les cellules NK, induite par les anticorps anti-CD20 et anti-HLA-DR exprimés dans CH et YB2/0 (324 03 082)

**Exemple 1 : Anti-HLA-DR**

20

**1.1 TEST ADCC CD16**

L'anticorps anti-HLA DR chimérique a été exprimé dans la cellule YB2/0 et dans CHO. Les anticorps chimériques anti-HLA-DR sont capables d'induire une activité cytotoxique de la cellule RAJI, exprimant à sa surface des antigènes HLA-DR. Pour ce faire, la même séquence codant pour une IgG1 spécifique de l'antigène HLA-DR est transfectée dans CHO et YB2/0. Les anticorps sont incubés avec les cellules RAJI (cibles) et les cellules Natural Killer (NK) humaines. L'activité cytotoxique des anticorps sur la cellule Raji (ADCC) a été évaluée après 16h d'incubation (voir figure 1).

Les deux anticorps anti-HLA-DR exprimés par YB2/0 (carré) ou CHO (triangle) induisent une lyse de la cellule Raji par ADCC. L'anticorps exprimé dans YB2/0 s'avère plus cytotoxique que CHO surtout dans des conditions de faibles quantités d'effecteurs et de faibles concentrations d'anticorps.

5

## 1.2 TEST IL-2

La même séquence codant pour une IgG1 spécifique de l'antigène HLA-DR est transfectée dans CHO et YB2/0. Les anticorps sont incubés avec les cellules RAJI 10 (cible) et les cellules Jurkat CD16 (effecteurs) portant l'acide aminé phénylalanine (F) en position 158. La quantité de cytokines (IL2) sécrétée par Jurkat CD16 est mesurée par ELISA (voir figure 2).

Les anticorps anti-HLA DR induisent une forte sécrétion d'IL2 (cytokine). 15 Comparativement, la sécrétion et donc le degré d'activation est supérieur lorsque l'anticorps est exprimé dans YB2/0 (carré) par rapport à CHO (triangle) à toutes les concentrations étudiées.

Exemple 2 : Corrélation *in vitro* entre ADCC et libération d'IL-2 de Jurkat 20 CD16.

Pour cette étude, 3 anticorps monoclonaux (Mab) anti-D ont été comparés.

Le Mab DF5-EBV a été produit par des Lymphocytes B humains obtenus chez un donneur immunisé D-négatif et immortalisés par transformation avec l'EBV. Cet 25 anticorps a été utilisé comme contrôle négatif étant donné que lors d'un essai clinique, il a été montré incapable d'éliminer les globules rouges rhésus positifs de la circulation.

L'anticorps monoclonal (Mab) DF5-YB2/0 a été obtenu en exprimant la séquence primaire de DF5-EBV dans la lignée YB2/0. L'anticorps monoclonal R297 et d'autres 30 anticorps recombinants ont également été exprimés dans YB2/0.

Ces anticorps sont testés in vitro pour leur capacité à induire une lyse des globules rouges traités à la papaïne en utilisant des cellules mononucléées (PBL) comme effecteur.

5 Tous les tests ont été effectués en présence d'immunoglobulines humaines (IVIg) de sorte à reconstituer les conditions physiologiques.

On pense que les IVIg se lient avec une haute affinité au FcgammaRI (CD64). Les deux Mab DF5-YB2/0 et R297 induisent une lyse des globules rouges à un niveau comparable à celui des anticorps polyclonaux WinRho. En revanche, le Mab DF5-

10 EBV est complètement inefficace.

Dans une deuxième série d'expérience, des cellules NK purifiées et des globules rouges non traités ont été utilisés comme effecteur et cibles respectivement. Après 5 heures d'incubation, les Mabs antiD-R297 et DF5-YB2/0 se sont montrés capables de provoquer la lyse des globules rouges, alors que DF5-EBV reste inefficace.

15 Dans ces deux expériences, la lyse des globules rouges a été inhibée par le Mab 3G8 dirigé contre le FcgammaRIII (CD16).

20 En résumé, ces résultats démontrent que l'ADCC provoquée par Mab R297 et Mab DF5-YB2/0 implique le FcgammaRIII exprimé à la surface des cellules NK.

Dans le cadre de l'invention, une troisième série d'expériences a été réalisé selon un test in vitro à l'aide de cellule Jurkat CD16 pour évaluer l'efficacité d'anticorps anti-D. Les Mab ont été incubés pendant une nuit avec des globules rouges Rhésus positif et 25 des cellules Jurkat CD16. La libération d'IL-2 dans le surnageant a été évaluée par ELISA.

Une forte corrélation entre l'ADCC et l'activation des cellules Jurkat a été observée, ce qui implique que ce test peut être utilisé pour faire la discrimination des Mabs anti-D en fonction de leur réactivité envers FcgammaRIII ( CD16).

Les mêmes échantillons sont évalués en ADCC et dans le test Jurkat IL2. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'anticorps de référence "LFB-R297". La courbe de corrélation entre les 2 techniques a un coefficient  $r^2=0.9658$  (Figure 3).

5 En conclusion, ces données montrent l'importance des modifications post-traductionnelles de la partie Fc des anticorps pour leur capacité à induire une activité ADCC spécifique du FcgammaRIII. La libération de cytokines telles que l'IL-2 est corrélée avec l'ADCC.

10 **Exemple 3 : activation de cellules NK et production d'IL2 et d'IFN $\gamma$**

Modèle de mise au point : lignée cellulaire Jurkat transfectée avec le gène codant pour le récepteur CD16. Applications : renforcement d'une réponse anti-tumorale. L'IL2 produite par les cellules effectrices activées induit une activation des lymphocytes T et 15 des cellules NK pouvant aller jusqu'à une stimulation de la prolifération cellulaire. L'IFN $\gamma$  stimule l'activité des CTLs et peut renforcer l'activité des macrophages.

**Exemple 4 : activation de monocytes macrophages et production de TNF et d'IL-1Ra**

20

Applications : renforcement de la phagocytose et induction de propriétés anti-inflammatoires. Le TNF produit par les cellules effectrices activées stimule la prolifération des macrophages et des lymphocytes infiltrant les tumeurs. L'IL-1Ra est une cytokine qui entre en compétition avec l'IL1 au niveau de son récepteur et exerce 25 ainsi un effet anti-inflammatoire.

**Exemple 5 : activation de cellules dendritiques et production d'IL10**

Applications : induction d'une tolérance spécifique à certains antigènes. L'IL10 est une molécule inhibitrice de l'activation de différentes cellules effectrices et de la production de cytokines.

5

**Exemple 6 : Induction de la sécrétion de cytokines par différentes cellules effectrices.**

10 Trois populations cellulaires ont été étudiées : les polynucléaires, les cellules mononucléées et les cellules NK. L'induction de la synthèse de cytokines est dépendante de la présence de la cible. Il y a peu de différences dans les profils du R297 et de l'anticorps polyclonal anti-Rhésus D, en terme de cytokines sécrétées par les cellules effectrices. AD1 est très souvent non inducteur de sécrétion de cytokines.

**Résultats :**

15 6.1 L'anticorps monoclonal anti-Rh D R297 et le polyclonal anti-Rh D WinRho induisent une sécrétion importante d'IL8 en présence de cellules mononucléées. Cette sécrétion est dépendante de la concentration d'anticorps et de la présence de la cible antigénique. L'anticorps AD1 est beaucoup moins efficace à induire la production d'IL8 par les cellules mononucléées (figure 4).

20 6.2 L'anticorps monoclonal anti-Rh D R297 et le polyclonal anti-Rh D WinRho induisent une sécrétion importante de TNF alpha, une sécrétion d'IL6, IFN gamma, IP10, TNF alpha et TGF Beta moins forte que supérieure à celles induites par AD1 par les cellules mononucléées. Cette sécrétion augmente avec la plus forte concentration d'anticorps pour l'IL6, IFN gamma, IP10, mais décroît pour le TNF alpha et le TGF Beta (figure 5).

25 6.2 L'anticorps monoclonal anti-Rh D R297 et le polyclonal anti-Rh D WinRho induisent une sécrétion très faible, mais supérieure à AD1, d'IL2, IFN gamma, IP10 et

TNF par les polynucléaires. Cette sécrétion est dépendante de la concentration d'anticorps (figure 6).

6.3 L'anticorps monoclonal R297 et le polyclonal WinRho induisent une sécrétion importante d'IFN gamma, IP10 et TNF par les cellules NK. Cette sécrétion est 5 dépendante de la concentration d'anticorps (figure 7).

**Exemple 7 : Anticorps anti-CD 20 et anti-HLA DR chimériques optimisés produits dans YB2/0**

10 **Introduction**

Nos premiers résultats ont montré que les anticorps anti-D produits dans YB2/0 ainsi que les anticorps polyclonaux utilisés en clinique induisaient une forte activité ADCC ainsi que la production de cytokines, en particulier de TNF alpha et d'interféron gamma (IFN gamma) à partir de cellules NK purifiées ou de cellules mononucléées. Par 15 contre d'autres anticorps anti-D, produits dans d'autres lignées cellulaires sont négatifs en ADCC et se sont révélés incapables d'induire cette sécrétion de cytokines.

Les résultats complémentaires ci dessous montrent que ce mécanisme n'est pas exclusif aux anti-D en présence d'hématies Rhésus positif mais s'applique également 20 aux anticorps anti-CD20 et anti-HLA DR exprimés dans YB2/0. L'expression dans CHO confère à l'anticorps des propriétés activatrices moins importantes. Ceci est en corrélation avec les résultats obtenus en ADCC.

**Matériel**

25 **Anticorps.**

Anti-CD20 : l'anticorps chimérique anti-CD20 transfété dans YB2/0 est comparé à un anticorps commercial anti-CD20 produit dans CHO (Rituxan).

Anti-HLA DR : la même séquence codant pour l'anticorps chimérique anti-HLA DR est transférée dans CHO (B11) ou YB2/0 (4B7).

*Cellules cibles* : cellules Raji exprimant à leur surface l'antigène CD20 et HLA-DR

*Cellule effectrices* : cellules NK humaines purifiées par sélection négative à partir de poches de sang humain.

5 **Méthode**

Différentes concentrations d'anticorps anti-CD20 ou anti-HLA DR sont incubées avec les cellules Raji et les cellules NK. Après 16 heures d'incubation, les cellules sont centrifugées. Les surnageants sont dosés en TNF alpha et IFN gamma.

10 **Résultats :**

1) *TNF alpha* : Les résultats sont exprimés en pg/ml de TNF alpha dosé dans les surnageants. En abscisse figure les différentes concentrations d'anticorps ajoutées dans le mélange réactionnel (figure 8).

15.

Les anticorps anti-CD 20 et anti-HLA DR chimériques produits dans YB2/0 induisent des taux plus importants de TNF en présence de leur cible (Raji) par rapport aux mêmes anticorps produits dans CHO. La quantité de TNF alpha est bien dose dépendante de la concentration d'anticorps ajouté. A 10ng/ml d'anticorps on induit 5 fois plus de TNF alpha avec les anticorps produits dans YB2/0 par rapport aux anticorps produits dans CHO.

20

2) *IFN gamma*: Les résultats sont exprimés en pg/ml de IFN gamma dosé dans les surnageants. En abscisse figure les différentes concentrations d'anticorps ajoutées dans le mélange réactionnel (figure 9).

25

Les anticorps anti-CD 20 et anti-HLA DR chimériques produits dans YB2/0 induisent des taux plus importants de IFN gamma en présence de leur cible (Raji) par rapport aux mêmes anticorps produits dans CHO. La quantité de IFN gamma est bien dose dépendante de la concentration d'anticorps ajouté. A toutes les concentrations utilisées

30

(0 à 200ng/ml) l'anticorps anti-HLA DR produit dans CHO n'induit pas de sécrétion d'IFN gamma, alors que 40ng/ml de l'anticorps produit dans YB2/0 induit environ 1000pg/ml d'IFN gamma.

5 Pour l'anticorps anti-CD20, il faut moins de 10ng/ml de l'anticorps produit dans YB2/0 et 200ng/ml de l'anticorps produit dans CHO pour induire 300pg/ml de IFN gamma (figure 9).

REVENDICATIONS

5        1. Anticorps monoclonal chimérique, humanisé ou humain produit dans une lignée cellulaire sélectionnée pour ses propriétés à glycosyler de façon particulières le fragment Fc d'un anticorps, ou dont la structure glycannique a été modifiée ex vivo, ledit anticorps présentant un taux ADCC de type FcγRIII (CD16) supérieur à 60 %, 70%, 80 % ou de préférence supérieur à 90 % comparé au même anticorps produit

10      dans une lignée CHO ou à un anticorps homologue disponible dans le commerce, et caractérisé en ce qu'il présente une capacité à induire un taux de production d'au moins une cytokine par la cellule Jurkat CD16 ou une cellule effectrice du système immunitaire exprimant le récepteur CD16 supérieur à 60 %, 100 % ou de préférence supérieur à 200 % comparé au même anticorps produit dans une lignée CHO ou à un

15      anticorps homologue disponible dans le commerce.

2. Anticorps selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il présente un taux ADCC supérieure à 100 % à une concentration 10ng/ml ou moins, comparé au même anticorps produit dans une lignée CHO ou à un anticorps homologue disponible dans le commerce et un taux de production d'au moins une cytokine par une cellule effectrice du système immunitaire exprimant le récepteur CD16 supérieur à 1000 % à une concentration de 10ng/ml ou moins, comparé au même anticorps produit dans une lignée CHO ou à un anticorps homologue disponible dans le commerce.

20      3. Anticorps selon l'une des revendications 1 à 2, caractérisé en ce que les cytokines libérées sont des interleukines.

25      4. Anticorps selon l'une des revendications 1 à 2, caractérisé en ce que les cytokines libérées sont des interférons.

5. Anticorps selon l'une des revendications 1 à 2, caractérisé en ce que les cytokines libérées sont des facteurs de nécrose tissulaire (TNF).
6. Anticorps selon l'une des revendications 1 à 2, caractérisé en ce que l'anticorps 5 sélectionné a la capacité d'induire la sécrétion d'au moins une cytokine choisie parmi IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL8, TNFa , TGF $\beta$ , IP10 et IFN $\gamma$  par les cellules effectrices exprimant le récepteur CD16.
7. Anticorps selon la revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que ce que l'anticorps 10 sélectionné a la capacité d'induire la sécrétion d'IL-2 par les cellules effectrices du système immunitaire exprimant le récepteur CD16.
8. Anticorps selon la revendication 1, 2 ou 7, caractérisé en ce que la cellule effectrice 15 est une cellule Jurkat exprimant le récepteur CD16 ou par une cellule leucocytaire, en particulier de la famille des NK (natural killer) ou par des cellules du groupe monocytes-macrophages.
9. Anticorps selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il est produit dans lignée cellulaire du type myélome de rat, notamment YB 2/0.
- 20
10. Anticorps selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il est dirigé contre un antigène d'une cellule pathologique ou d'un organisme pathogène pour l'homme, en particulier contre un antigène d'une cellule cancéreuse.
- 25
11. Anticorps selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il est de spécificité anti-Rhésus D du globule rouge humain.
12. Anticorps selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il est un anti-HLA-DR.

13. Anticorps selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il présente un taux ADCC supérieur à 100 % à une concentration de 10 ng/ml ou moins et un taux de production d'IL-2 par une cellule effectrice du système immunitaire exprimant le récepteur CD16 supérieur jusqu'à 1000 % à une concentration de 10 ng/ml ou moins comparé au même anticorps exprimé dans la lignée CHO, lignée d'expression du Remitogen®.

5

14. Anticorps selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il est produit dans une lignée de myélome de rat, notamment YB2/0.

10 15. Anticorps selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il est un anti-CD20.

16. Anticorps selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il présente un taux ADCC supérieur à 100 % à une concentration de 10 ng/ml ou moins et un taux de production d'IL-2 par une cellule effectrice du système immunitaire exprimant le récepteur CD16 supérieur jusqu'à 1000 % à une concentration de 10 ng/ml ou moins comparé au Rituxan®.

15

17. Anticorps selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il est produit dans une lignée de myélome de rat, notamment YB2/0.

20

18. Anticorps selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il est sélectionné parmi les anti Ep-CAM, anti-KIR3DL2, anti-VEGFR, anti HER1, anti HER2, anti GD, anti GD2, anti GD3, anti CD-23, anti-CD30, anti-CD33, anti-CD38, anti-CD44, anti CD52, anti CA125 et anti ProteinC; anti Ep-CAM, anti HER2, anti CD52, anti HER1, anti GD3, anti CA125, anti GD, anti GD2, anti CD-23 et anti ProteinC; les anti-viraux: HBV, HCV, HIV et RSV, des anti-idiotypes spécifiques d'inhibiteurs par exemple de facteurs de coagulation dont le FVIII et FIX..

25

19. Utilisation d'un anticorps selon l'une des revendications 1 à 18 pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement des cancers et des infections par des agents pathogènes.

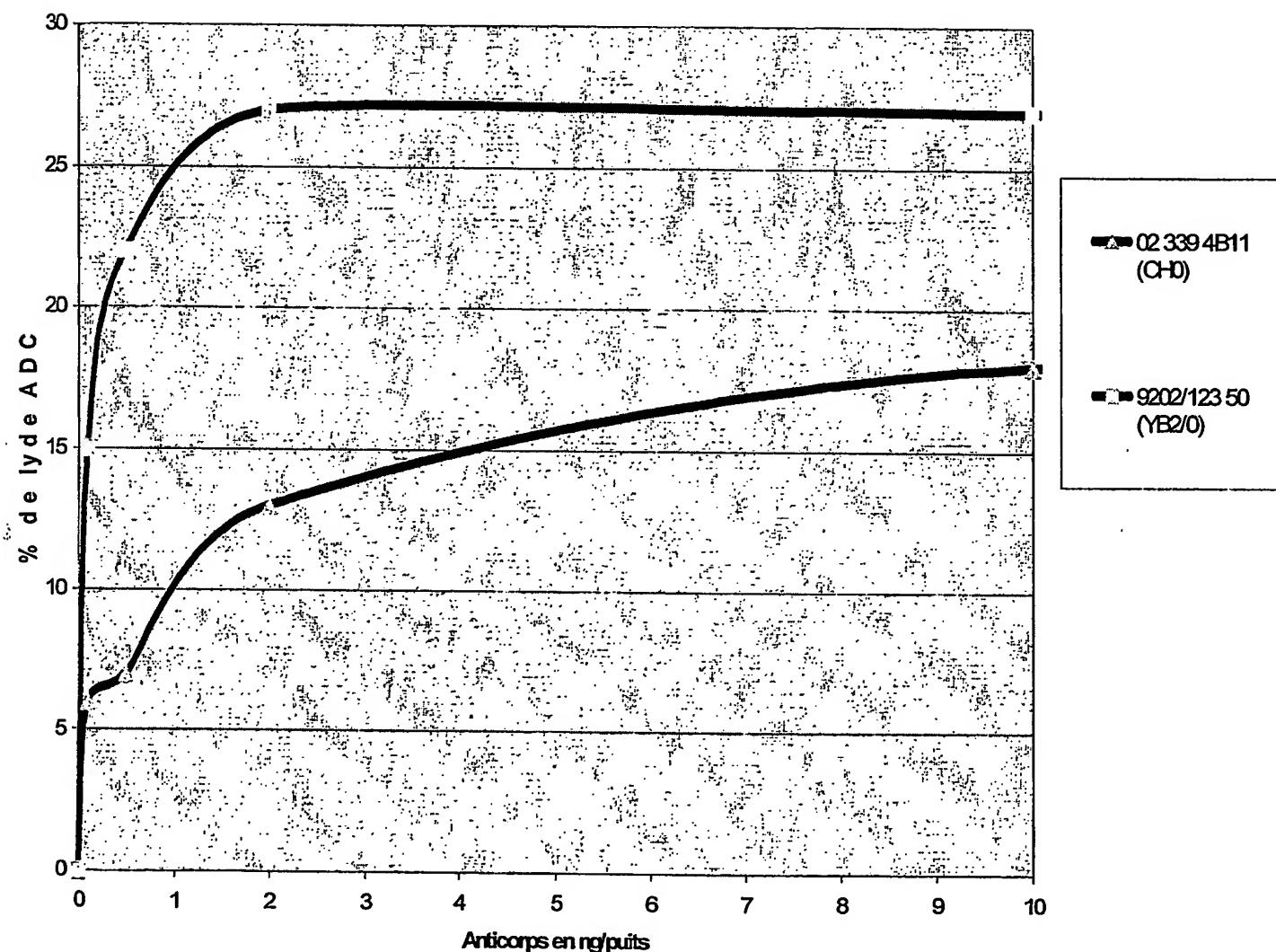
5 20. Utilisation d'un anticorps selon l'une des revendications 12 à 14 et 15 à 17 pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement des cancers des cellules MHC de classe II positives, notamment les lymphomes de cellules B, les leucémies aiguës de cellules B, le lymphome de Burkitt, le lymphome de Hodgkin, les leucémies myéloïdes, les lymphomes et leucémies de cellules T, les lymphomes non hodgkinien  
10 et les leucémies myéloïdes chroniques.

15 21. Utilisation d'un anticorps selon l'une des revendications 12 à 14 et 15 à 17 pour la fabrication d'un médicament destiné à induire l'expression de TNF, IFN $\gamma$ , IP10 et IL-6 par les cellules effectrices naturelles du système immunitaire, ledit médicament étant utile notamment pour le traitement du cancer et des infections.

1 / 9

**Lyse ADCC des cellules Raji, induite par des anticorps anti-HLA-DR exprimés dans CHO (triangle) ou YB2/0 (carré).**

TOX324 02/055 RATIO EFF/CIBLE 3/1

**FIGURE 1**

2 / 9

Sécrétion d'IL2 par les cellules Jurkat CD16, induite par des anticorps anti-HLA-DR exprimés dans CHO (triangle) ou YB2/0 (carré) .

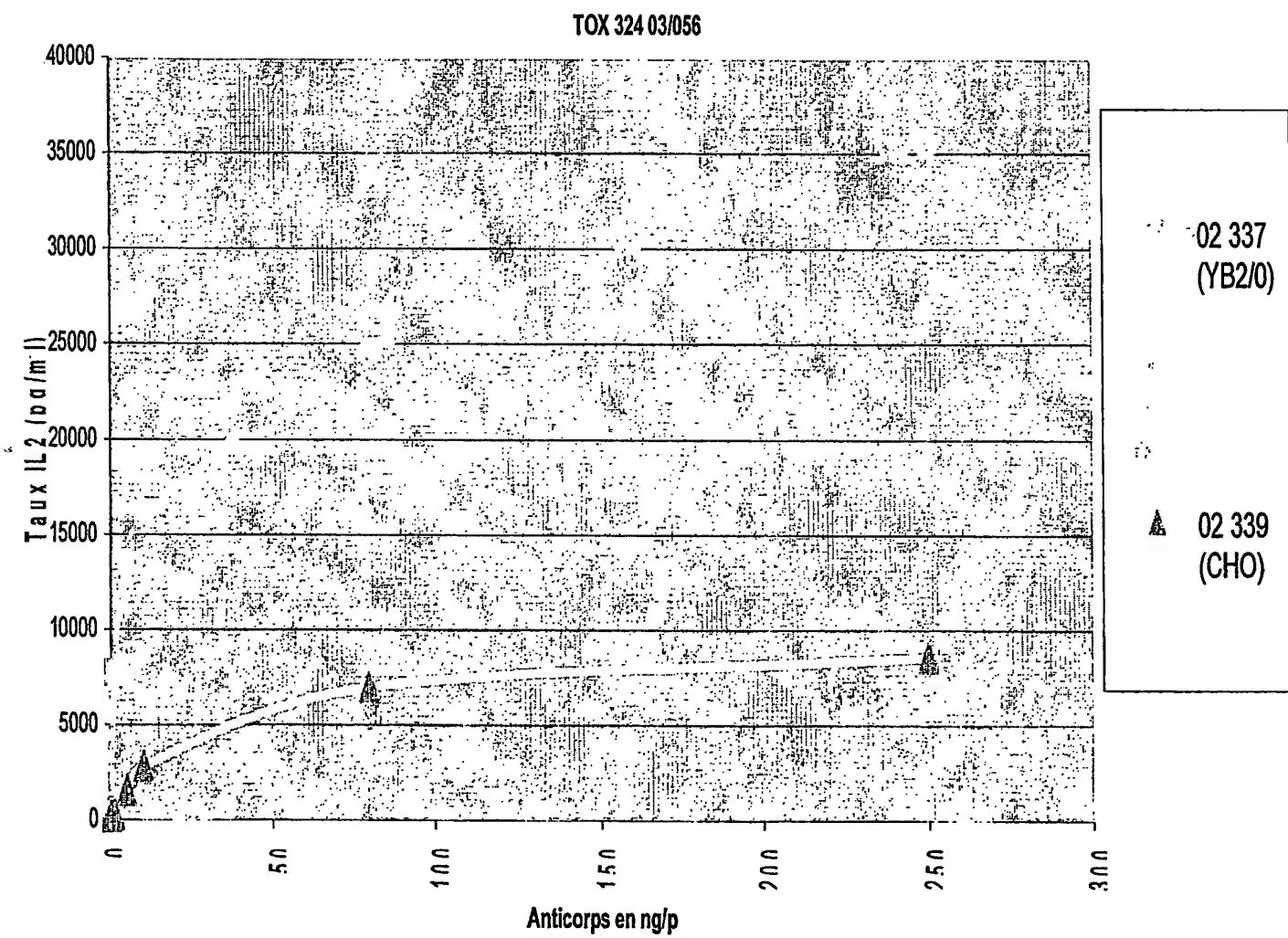
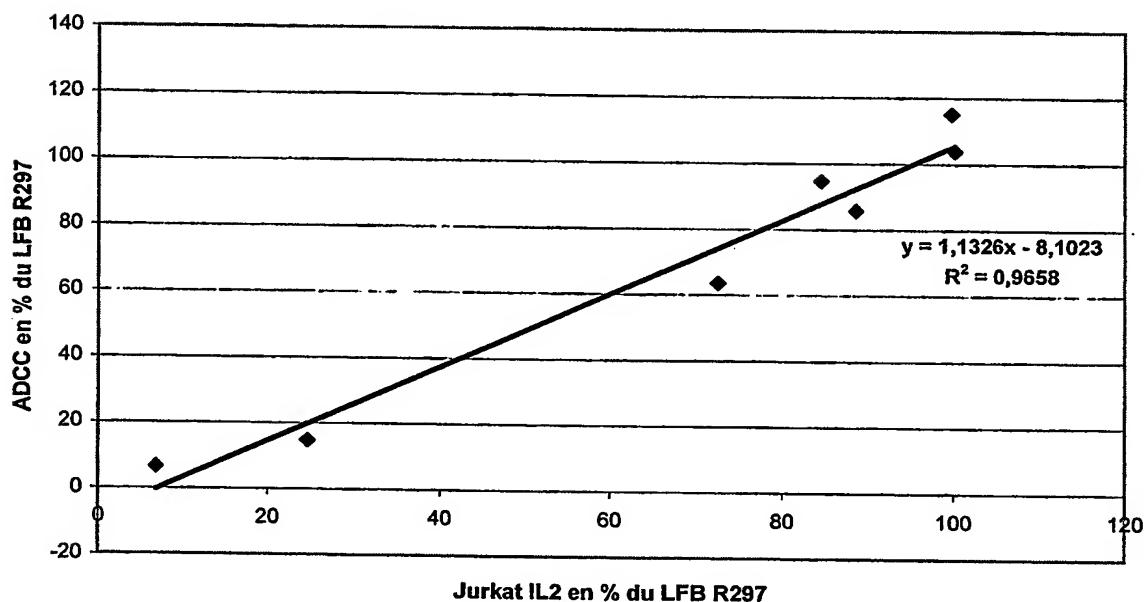


FIGURE 2

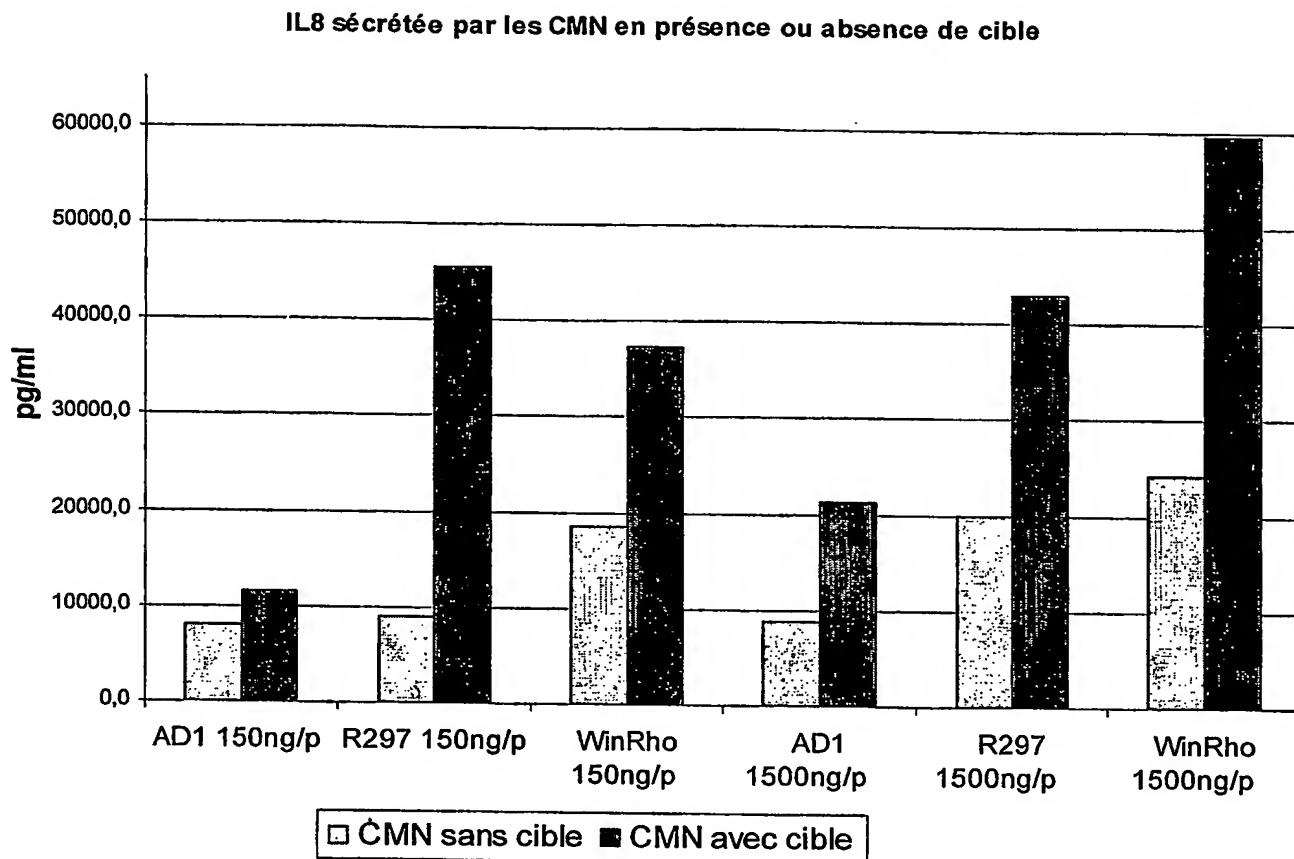
3 / 9

**Corrélation entre le pourcentage d'ADCC supportée par les cellules NK et la sécrétion d'IL2 par les cellules Jurkat CD16.**

Corrélation ADCC teg 500 à 7,5ng/puits et Jurkat IL2  
ADCC 305 03 128-129-132-134-138  
IL2 289 03 129-136-139-148



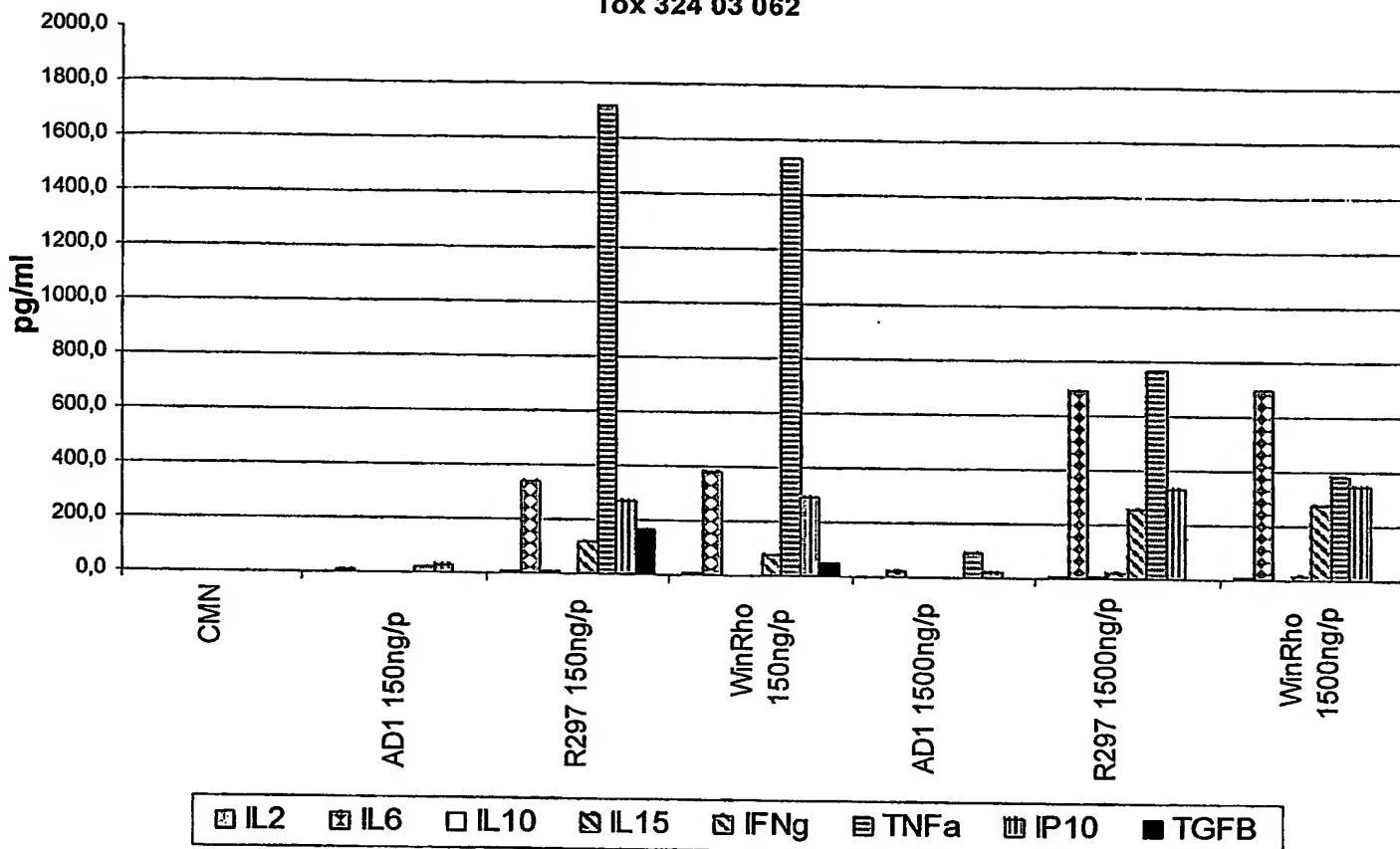
**FIGURE 3**

**FIGURE 4**

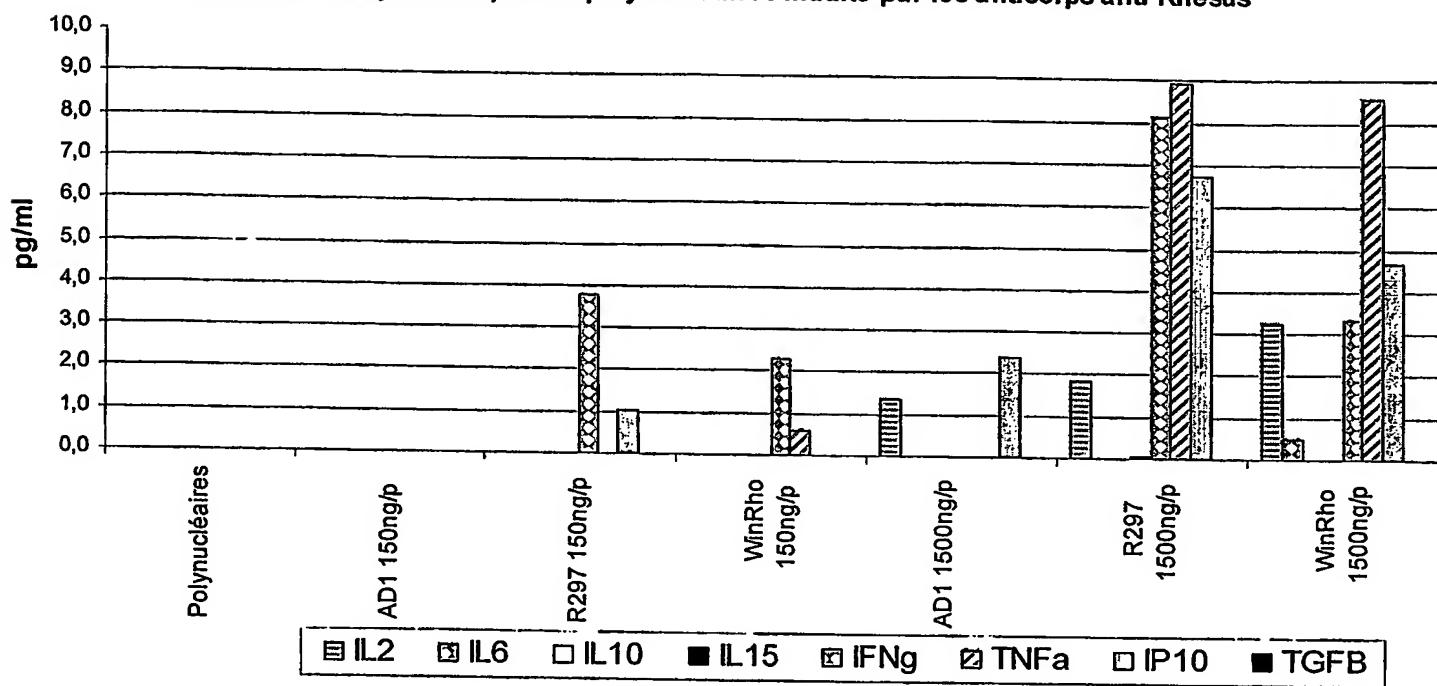
5 / 9

**Secréction de cytokines par les CMN induite par les anticorps anti-Rhésus**  
**(valeur sans cible déduite)**

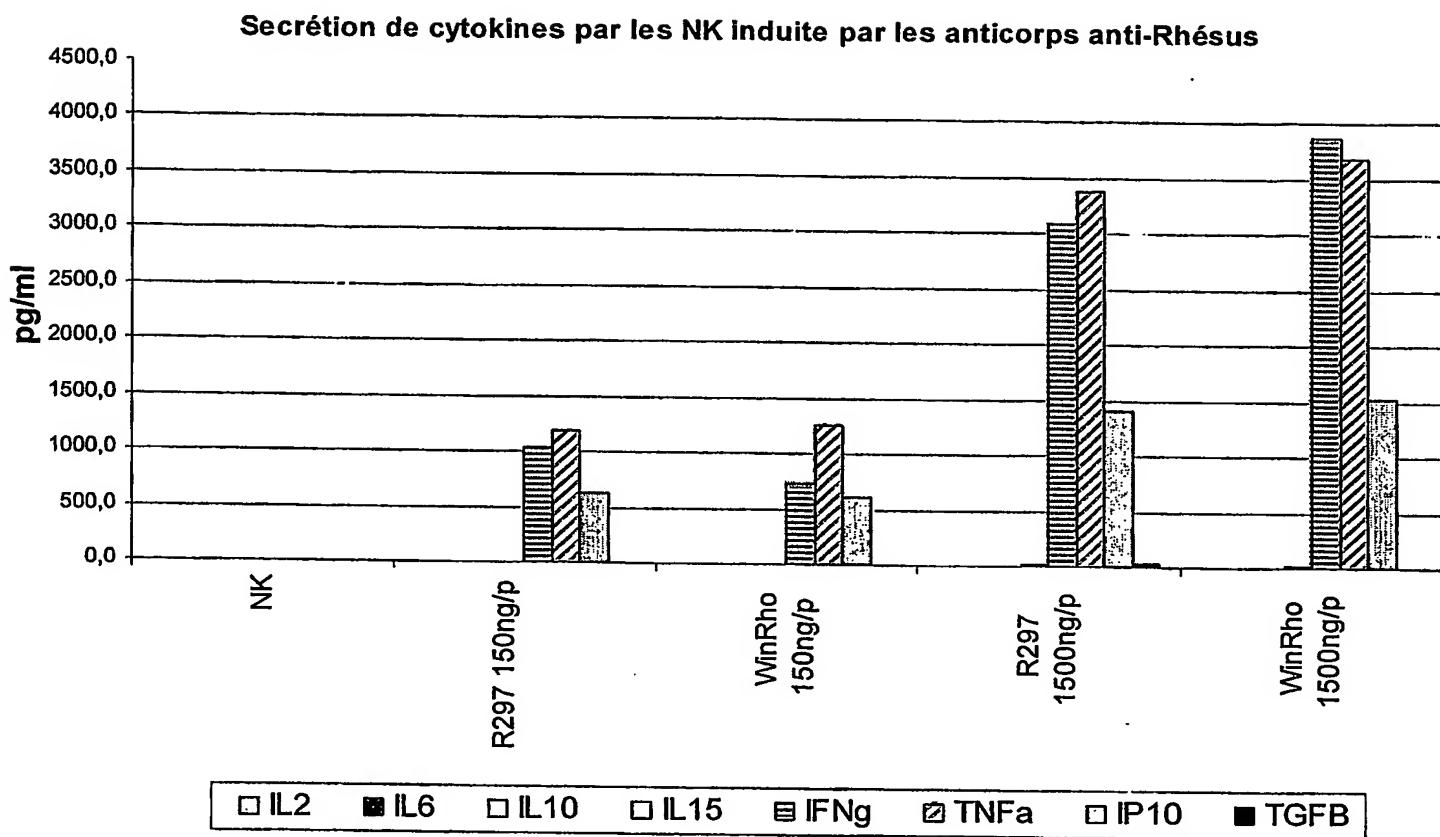
Tox 324 03 062

**FIGURE 5**

6 / 9

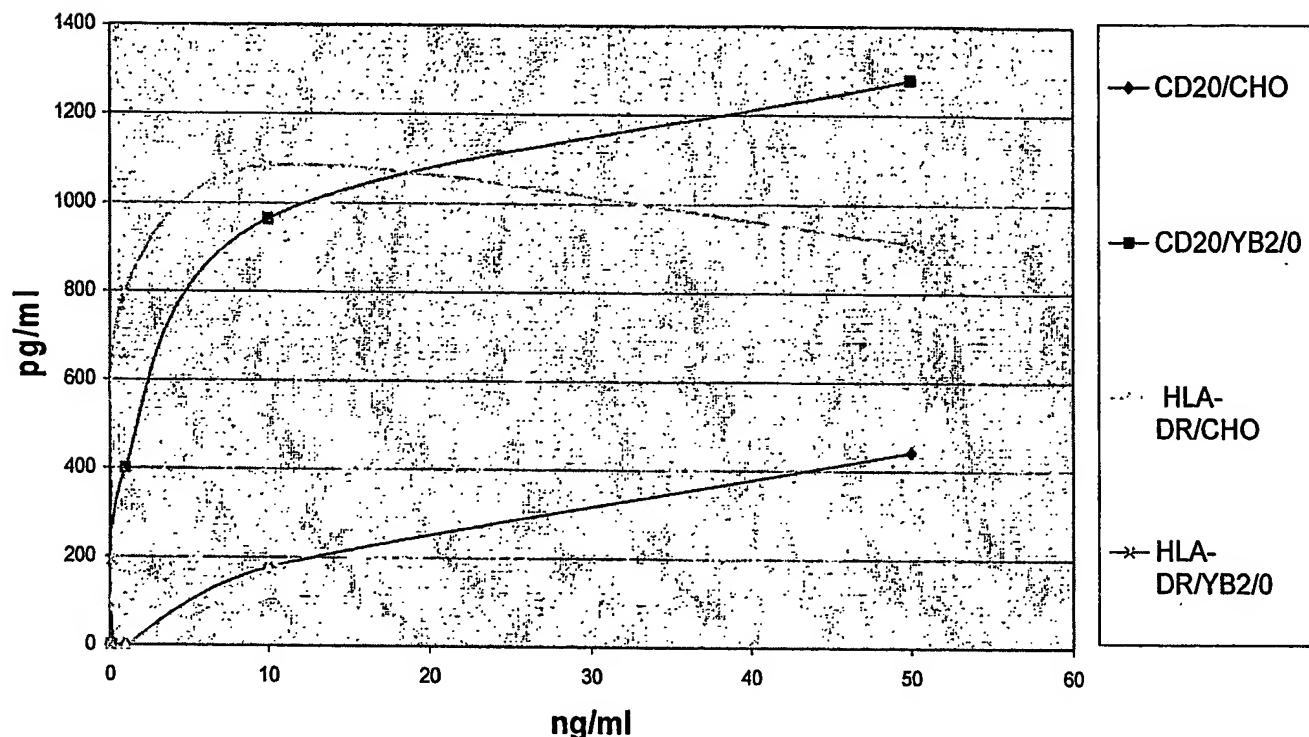
**Secréction de cytokines par les polynucléaires induite par les anticorps anti Rhésus****FIGURE 6**

7 / 9

**FIGURE 7**

8 / 9

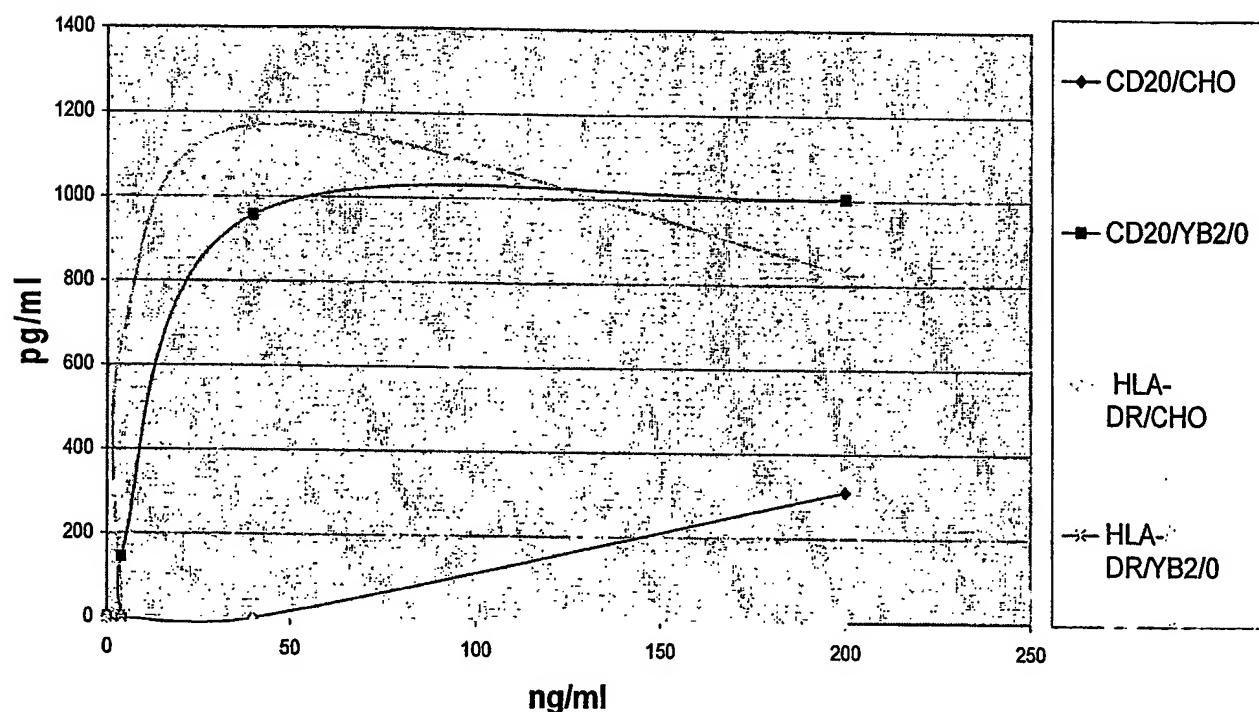
**Sécrétion de TNF alpha par les cellules NK, induite par les anticorps anti-CD20 et anti-HLA DR exprimés dans CHO et YB2/0 (324 03 082)**



**FIGURE 8**

9 / 9

**Sécrétion d'IFN gamma par les cellules NK, induite par les anticorps anti-CD20 et anti-HLA DR exprimés dans CHO et YB2/0 (324 03 082)**



**FIGURE 9**

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**